

Investigación básica con células madre pluripotentes en la Escuela Médico Militar

Mayor M.C. Mónica Maribel **Mata-Miranda,***

Cap. 1/o. Q.B. Virginia **Sánchez-Monroy,**** Mayor M.C. Gustavo Jesús **Vázquez-Zapién*****

Escuela Médico Militar. Ciudad de México.

RESUMEN

El estudio y uso de las células madre (SC, del inglés *stemcells*) en la terapia de reemplazo celular, ha establecido un gran paso a una nueva era en la medicina. Sin embargo, la ciencia aún se ha visto superada por diferentes ámbitos a la hora de decidir el lugar y el momento en que esta nueva alternativa se haga realidad.

Las SC son células inmaduras, autorrenovables y capaces de generar uno o más tipos de células diferenciadas y se clasifican de acuerdo con su potencial de diferenciación en totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales.

El trasplante de SC parece una herramienta prometedora para la regeneración de tejidos enfermos, dañados o defectuosos. Las células madre mesenquimales (MSC) ya se han utilizado para restaurar células hematopoyéticas desde hace más de 50 años, pero los rápidos adelantos en la investigación han planteado la posibilidad de usar otros tipos de células madre para el reemplazo celular y tisular, como las células madre embrionarias (ESC) pluripotentes en diabetes mellitus (DM).

En los Laboratorios de Investigación de la Escuela Médico Militar (EMM), recientemente se iniciaron trabajos de Investigación Básica para la caracterización y estandarización de cultivos celulares de ESC de ratón y su diferenciación a células pancreáticas tempranas.

El objetivo de este artículo es difundir las generalidades y aplicaciones de las SC, así como las Investigación Básica que se realiza en el Instituto Armado con estas células.

Palabras clave: Células madre, células madre embrionarias, pluripotencialidad, cuerpos embrionarios, células pancreáticas diferenciadas.

Basic research with pluripotent stem cells in the Military Medical School

SUMMARY

The study and use of stem cells (SC) in cell replacement therapy are setting a great transition for a new medicine era. However, different fields have overtaken science at the time to decide where and when this new alternative will come a reality.

The SC are immature cells, self-renewable and capable to generate one or more types of differentiated cell, according to their differentiation capacity they classified in: totipotent, pluripotent, multipotent and unipotent.

SC transplantation seems a promising tool for the regeneration of diseased, damaged or defective tissue.

Mesenchymal stem cells (MSC) have been used to restore hematopoietic cells for over 50 years, but the expedited advances in research, have raised the possibility to use another type of SC for cell and tissue replacement, as embryonic SC (ESC) in diabetes mellitus (DM).

In the Research Laboratory at Escuela Médico Militar (EMM), recently some basic research have been initiated for the characterization and standardization of mouse ESC cultures, and their differentiation into early pancreatic cell.

The purpose of this article is to spread the generalities and applications of SC, and the basic research that is done in the Armed Forces Institute with this cells.

Key words: Stem cells, embryonic stem cells, pluripotentiality, embryonic bodies, differentiated pancreatic cells.

* Maestra en Ciencias Biomédicas, Jefe del Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar y alumna de doctorado del Centro de Investigación en Biotecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional. ** Doctora en Ciencias con Especialidad en Biomedicina Molecular, adscrita a la Escuela Militar de Graduados de Sanidad y al Instituto Politécnico Nacional. *** Maestro en Ciencias Biomédicas, Jefe del Laboratorio de Embriología de la Escuela Médico Militar y alumno de doctorado del Centro de Investigación en Biotecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional.

Correspondencia: Dr. Gustavo Jesús Vázquez-Zapién
Escuela Médico Militar, Laboratorio de Embriología, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Cerrada de Palomas s/n Esq. Periférico, Col. Lomas de San Isidro, C.P. 11200, México, D.F. Correo-e: gus1202@hotmail.com

Recibido: Enero 29, 2014.

Aceptado: Mayo 16, 2014.

Generalidades sobre células madre

Las células madre (SCD, del inglés *stemcells*) son inmaturas, autorrenovables y capaces de generar uno o más tipos de células diferenciadas. En condiciones adecuadas pueden dividirse indefinidamente conservando siempre una población estable y, recibiendo estímulos específicos, se pueden diferenciar hacia diversos tipos de células especializadas de un organismo adulto.¹

En 1912 los experimentos de Carrel sobre cultivos de corazón de embrión de pollo, marcaron nuevas alternativas hacia la medicina regenerativa; sin embargo, fue hasta 1960 cuando McCulloch y Till estudiaron los efectos de las células de la médula ósea en ratones radiados, surgiendo el término de SC a finales del siglo XX por los histoembriólogos Boveri y Haecker, quienes describieron las características hereditarias de las células germinales, su potencialidad y su autorrenovación.²

Anteriormente las SC se clasificaban de manera general en adultas o somáticas y embrionarias.³ Sin embargo, actualmente la clasificación más utilizada es la que se establece de acuerdo con su descendencia y potencial de desarrollo, así, es posible reconocer cuatro tipos de SC:⁴ totipotenciales, como las primeras cuatro células resultantes de las primeras segmentaciones del cigoto, las cuales pueden generar todas las células de un organismo adulto, incluidas las células somáticas, germinales y extraembrionarias;⁵ pluripotenciales, representadas principalmente por las células madre embrionarias (ESC) que pueden generar todos los tipos celulares del organismo, pero no pueden dar origen a las células de la placenta y se derivan de la masa celular interna (MCI) de un embrión al estado de blastocisto, dependiendo de la especie, de cuatro a siete días después de la fecundación;⁶ multipotenciales, las cuales poseen una capacidad limitada para diferenciarse, dando origen sólo a las células de un órgano concreto en el embrión y/o en el adulto, por ejemplo, las células madre mesenquimales (MSC) de la médula ósea;⁷ finalmente las células unipotenciales, con capacidad proliferativa limitada y una tendencia a originar células terminales.⁴

En el 2006 en la Universidad de Kyoto, Japón, el Dr. Shinya Yamanaka y cols. describieron una técnica para reprogramar células somáticas o adultas al insertar genes de pluripotencialidad, produciendo células madre pluripotenciales inducidas (iCMP)⁸ que se pueden considerar dentro de una nueva clasificación.

Células madre embrionarias

Recientemente se describieron técnicas que permiten la extracción de una ESC sin la destrucción del embrión, similar a la técnica utilizada en la preimplantación para el diagnóstico genético.⁹

Este tipo de células han sido investigadas intensamente, ya que poseen tres características que las hacen únicas en relación con otras SC específicas de órganos identificadas hasta la fecha:

- Capacidad de autorrenovación *in vitro*, es decir, pueden mantenerse en cultivo luego de numerosos pases y durante periodos prolongados como una población homogénea de células indiferenciadas, conservando un cariotipo normal.¹⁰
- Pluripotencialidad, pudiendo originar bajo estímulos adecuados, casi todas las células de un individuo.¹⁰
- Inmunogenicidad baja en comparación con células madre adultas alogénicas, debido a la baja expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad I (MHC-I) y falta de expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad II (MHC-II).¹¹

Caracterización de las células madre embrionarias

Aunque parece no haber duda de que las ESC aisladas de blastocitos tengan capacidad pluripotente, la cuestión importante está en saber si también las líneas celulares que crecen permanentemente en cultivo retienen sus características iniciales. La presencia o ausencia de marcadores específicos indica si las ESC en cultivo permanecen o no en el estado indiferenciado.

Un gran número de marcadores de superficie están siendo usados actualmente para caracterizar las ESC, incluyendo varios glucolípidos y glucoproteínas que fueron identificados originalmente en células de carcinoma embrionario o en embriones en estadio preimplantacional.¹²

Según la Iniciativa Internacional de CM, las ESC deben poseer una expresión similar de marcadores, característicos de su capacidad de autorrenovación y pluripotencia. Estos marcadores de superficie deben expresar los antígenos SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA1-81, GCMT2 y GCT343. Además, deben expresar una serie de genes asociados al mantenimiento de la pluripotencia: *nanog*, *pou5f1* (*oct-3/4*) y otros 14 genes cuya expresión está asociada a *nanog*.¹³

El microambiente de las células madre

El microambiente de las CM también denominado «nicho», es la suma de todos los factores celulares y moleculares que regulan e interactúan con las mismas células.¹⁴

El nicho específico de cada linaje definirá de manera precisa la forma de división de la SC y el destino de las células hijas, es decir, una división simétrica o asimétrica, ya que el nicho puede orientar la división de las células haciendo que sólo una de las células hijas herede moléculas de unión a la membrana basal del nicho, permitiendo que una célula sea liberada del nicho y proceda a diferenciarse o, por el contrario, si el nicho permite que las dos células hijas hereden las moléculas de adhesión, entonces la población de células se mantendrá estable.¹⁵

Las moléculas de adhesión más ampliamente estudiadas son las integrinas, mismas que mantienen a las SC en posición y la pérdida o alteración de estas moléculas causa que estas células se diferencien o inicien la apoptosis, además que pueden activar receptores de factores de crecimiento.

Las integrinas α y β se encuentran sobre-expresadas en la capa basal del nicho germinal de los mamíferos, lo cual permite que las CM de las espermatogonias se mantengan unidas al nicho.¹⁶

Cultivo de células madre embrionarias

Desde que se obtuvieron los primeros cultivos de ESC de ratón derivadas de blastocitos en 1981 por Evans y Kaufman, se sentaron las bases para el desarrollo de las metodologías necesarias que conducirían más tarde a obtener ESC humanas, con propiedades y características similares a las estudiadas en el ratón,¹⁷ siendo esta similitud y los asuntos bioéticos relacionados, las principales justificaciones por las que muchos de los trabajos de investigación continúan utilizando este modelo.

En 1987 Smith y cols. cultivaron ESC de ratón sobre monocapa de fibroblastos de ratón de la línea celular STO (S, ratones Sim; T, 6-resistente a la tioguanina; O, resistente a la ouabaina), empleando además factor inhibidor de leucemia (LIF) recombinante en combinación con suero fetal bovino, debido a que el FIL es una citocina secretada por los fibroblastos que ayuda a mantener la autorrenovación y pluripotencia de las CME.^{18,19}

Actualmente se considera indispensable el suplemento de cualquier medio de cultivo para CME con factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), ya que se ha demostrado que este factor actúa sobre células accesorias que necesitan las CM para vivir, además de evitar que las CME se diferencien en alguno de los 200 tipos de células especializadas del organismo, permitiendo al investigador conservar en el laboratorio material biológico en estado adecuado y el tiempo necesario hasta destinarlo a futuras aplicaciones.²⁰

Desde hace tres años en los Laboratorios de Investigación de la EMM se han realizado trabajos de Investigación Básica caracterizando y estandarizando las técnicas de cultivo de ESC de ratón pluripotentes, primeramente con el objetivo de expandir estas células sobre monocapas de fibroblastos como se observa en la *figura 1* y, posteriormente, mantener en criopreservación una reserva de ESC que se puedan utilizar para diferentes protocolos de diferenciación.

Las ESC se propagan por disociación enzimática de las colonias y una célula individual genera la formación de nuevas colonias, siendo ésta una de las principales características del cultivo de estas células, además de ser sensibles a las enzimas utilizadas para la disociación, incluidas la tripsina.²¹

Las ESC de ratón cuando son inducidas a un programa de diferenciación y en ausencia de factores anti diferenciación *in vitro*, forman agregados celulares tridimensionales llamados cuerpos embrionarios (EB, del inglés *embryonic bodies*).²²

Inicialmente los EB son paquetes celulares densos que están rodeados por una sola capa de células parecida a las células endodérmicas, llegando a ser cavitado y formándose posteriormente un EB cístico producto de una diferenciación espontánea, considerado como CE maduro que contiene diversos tipos celulares.²³

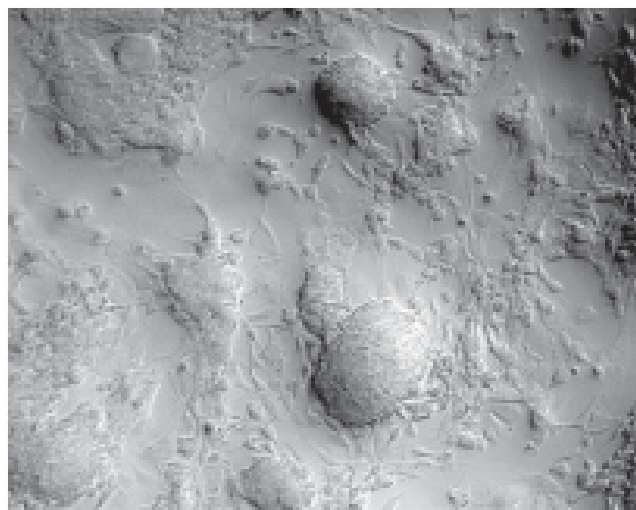


Figura 1. Cultivo de células madre embrionarias (ESC) de ratón formando colonias sobre monocapa celular de fibroblastos embrionarios de ratón (microscopía de campo claro 10X). Fuente: Directa.

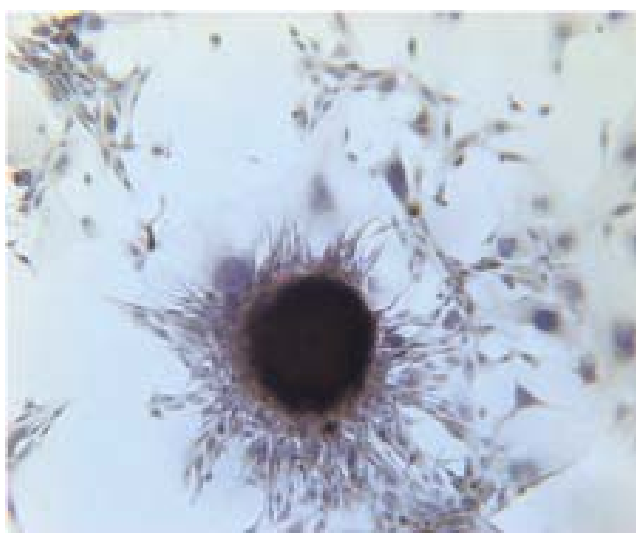


Figura 2. Cuerpo embrionario (EB) diferenciado a partir de células madre embrionarias (ESC) de ratón, conformado con células pancreáticas tempranas diferenciadas (microscopía de campo claro 10X). Fuente: Directa.

En nuestros laboratorios, una vez que se expandieron las ESC de ratón, se sometieron a un protocolo de diferenciación hacia células pancreáticas tempranas productoras de insulina y glucagón, obteniendo EB conformados por estas células diferenciadas a partir de las ESC de ratón como se muestra en la *figura 2*.

Relevancia de las células madre en la investigación

La aplicación de las CME que ha recibido mayor atención en los últimos años es la terapia de reemplazo celular, que permitiría el tratamiento de una amplia variedad de enferme-

dades debilitantes, tales como enfermedades cardiovasculares, enfermedad de Parkinson, enfermedades de las células sanguíneas y diabetes mellitus (DM).²⁴ Esta última es considerada según la OMS una amenaza mundial y, en nuestro país se reporta una muy alta prevalencia y sin duda alguna su control representa el mayor reto que enfrenta el Sistema Nacional de Salud, ya que es la primera causa de muerte y la principal causa de demanda de atención médica en Consulta Externa, situada dentro de las principales causas de hospitalización y la enfermedad que consume el mayor porcentaje del gasto de nuestras instituciones públicas.²⁵

En este caso, lo que se busca es reemplazar células dañadas por células funcionales que restituyan la función normal de los tejidos u órganos de forma más eficiente que a través de terapias convencionales como son los trasplantes, las terapias farmacológicas y/o los tratamientos con proteínas recombinantes.

Es por eso que las células productoras de insulina generadas de SC pueden representar una nueva alternativa terapéutica y una fuente de reemplazo de células β . La habilidad de las CM de varios orígenes para la diferenciación en células productoras de insulina, ha traído nuevas esperanzas terapéuticas.²⁶

Se han propuesto alternativas para la obtención de células β para sustituir la escasez de este linaje celular a partir de ESC o de SC de tejido adulto como páncreas, hígado, sistema nervioso central, médula ósea y adipocitos, así como también de MSC.²⁷

Algunos trabajos de investigación en los que se han utilizado ESC de ratón para su diferenciación a células pancreáticas, han mostrado la capacidad de revertir la DM inducida en modelos animales.²⁸

En la última década se ha visto un progreso muy marcado basado en la terapia celular, tanto en la DM tipo 1 como en la tipo 2. Se han desarrollado protocolos sobre ESC humanas que pueden inducirse para diferenciarse en células β funcionales.²⁹

Una célula β funcional ha sido generada *in vitro* a partir de SC, por lo que el futuro apunta a la recreación de la configuración tridimensional apropiada lo cual favorecerá el contacto celular correcto y las interacciones de la matriz extracelular, así como las vías de señalización activadas a través de numerosos tipos celulares, incluyendo endócrino, mesenquimatoso, neuronal y endotelio vascular, que se sabe forman parte estructural de los islotes.³⁰

Consideraciones finales

En nuestro país no existen grupos de investigación que trabajen con ESC, ya sea para expansión o diferenciación hacia las tres líneas germinales como son ectodermo, mesodermo y endodermo, por lo que en los Laboratorios de Investigación de la EMM se inició una línea de investigación utilizando ESC de ratón para diferenciación en una primera etapa a la línea germinal endodérmica y, posteriormente, en una segunda fase utilizando factores de diferenciación y especificación pancreática, para diferenciarlas a células pancreáticas

cas tempranas productoras de insulina y glucagón, basándose en protocolos realizados en laboratorios internacionales.³⁰⁻³¹

Hasta el momento, los resultados obtenidos han sido la caracterización génica mediante cuantificación del mensajero con reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción en tiempo real (RTq-PCR) de genes endodérmicos (*sox-17* y *pdx-1*) y pancreáticos (*insulina-1* e *insulina-2*), la caracterización morfológica a través de microscopía directa y citometría de flujo de las ESC de ratón y las células pancreáticas diferenciadas, así como la determinación de expresión de las proteínas insulina y glucagón en los e conformados por células pancreáticas tempranas, utilizando la técnica de inmunodetección mediante microscopía fluorescente y citometría de flujo.

Asimismo, se han utilizado los cultivos de ESC de ratón para su implante en un modelo murino con trauma ocular, observando resultados significativos en la respuesta inflamatoria y en la restauración de la integridad histológica, determinándose con la técnica de espectroscopia vibracional la incorporación de estas células al tejido ocular.

Actualmente se está implementando el uso de estas células pancreáticas diferenciadas en un modelo diabético murino, así como el inicio de una línea de investigación de diferenciación de ESC de ratón a mesodermo y posteriormente a células renales, con la finalidad de implantarlas igualmente en un modelo murino con lesión renal para determinar su capacidad de regeneración.

Conclusiones

La continuidad de estos proyectos de Investigación Básica, empleando ESC de ratón y realizando diferentes protocolos de diferenciación hacia las tres líneas germinales y, su posterior diferenciación celular específica, serviría de soporte para el inicio de una Investigación Aplicada en modelos animales de diversos padecimientos y diferentes áreas de la medicina, como es la diferenciación a células renales, cardiomiocitos, hepatocitos, neuronas, condrocitos, entre otros, lo cual fortalecería en un futuro el arsenal terapéutico para enfermedades con alto impacto social e institucional.

Agradecimientos

El trabajo fue apoyado por el Programa Presupuestario A022-2014. Agradecemos la colaboración para la realización del trabajo al Tte. Cor. M.C. Salvador Martín Polo Soto por su gran apoyo y motivación.

Referencias

1. Das S, Bonaguidi M, Muro K, Kessler JA. Generation of embryonic stem cells: limitations of and alternatives to inner cell mass harvest. *Neurosurg Focus* 2008; 24: 1-12.
2. Mata-Miranda MM, Vázquez-Zapién GJ, Sánchez-Monroy V. Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatol Reprod Hum* 2013; 27(3): 194-9.

3. Tim UK. Stem cell therapy in retinal diseases. *Retinal Physician* 2011; 5: 26-9.
4. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Inmunología de Kubly*, 6a. Ed. México, D.F. McGraw Hill Interamericana; 2007, p. 32-5.
5. Gjorret JO, Maddox HP. Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell like cultures. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17: 113-24.
6. Hooper M. Embryonal stem cells: introducing planned changes into the germline, primera edición, Chur Switzerland: Harwood Academic Publishers; 1992, p. 52-5.
7. Lovell BR. The future for stem cell research. *Nature* 2001; 414: 88-91.
8. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-72.
9. Chung Y, Klimanskaya I, Becker S. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 113-17.
10. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 1984; 309: 255-6.
11. Brunt KR, Weisel DR, Ren KL. Stem cells and regenerative medicine future perspectives. *Can J Physiol Pharmacol* 2012; 90: 327-35.
12. Hoffman LM, Carpenter MK. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 699-708.
13. Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund RL, Amit M. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 803-16.
14. Walker Mr, Patel KK, Stappenbeck. The stem cell niche. *J Pathol* 2009; 217: 169-80.
15. Spradling A, Drummond BD, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001; 287: 1427-30.
16. Giraldo JP. Artículo de revisión de células madre. *Rev Colomb Obst Gin* 2003; 54(2): 87-95.
17. Evans MJ, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-6.
18. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 1998; 12(13): 2048-60.
19. Keira SM, Ferreira LM, Gragnani A. Experimental model for fibroblast culture. *Acta Cir Bras* 2004; 19: 11-15.
20. Bendall SC, Stewart MH, Menendez P, George D. IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature* 2007; 448: 1015-21.
21. Arias ME, Felmer R. Biología de las células madre embrionarias en distintas especies: potenciales aplicaciones en biomedicina. *Arch Med Vet* 2009; 41: 185-95.
22. Lahy A, XiongJW, Kuhnert F, Stuhlmann H. Use of developmental markers genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid formation. *Jour Exp Zoo* 1999; 284: 67-81.
23. Dvash T, Mayshar Y, Darr H. Temporal gene expression during differentiation of human embryonic stem cells and embryoid bodies. *HumReprod* 2004; 19(12): 2875-83.
24. Doss MX, Koehler CI, Gissel C, Hescheler J, Sachinidis A. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 465-73.
25. S. d. Salud. Programa Nacional de Salud 2007-2012. 1a. Ed. México, D.F.: Secretaría de Salud; 2007.
26. Wong RS. Extrinsinc factors involved in the differentiation of stem cells into insulin-producing cells. *Exp Diab Res* 2011; 2011: 1-15.
27. Domínguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diab Care* 1998; 21: 1736-42.
28. Jiang W, Shi Y, Zhao D. In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Res* 2007; 17: 333-44.
29. Baetge EE. Production of beta-cells from human embryonic stem cells. *Diab Obes Metab* 2008; 10(4): 186-94.
30. Ku HT. Committing embryonic stem cells to early endocrine pancreas in vitro. *Stem Cells* 2004; 22: 1205-17.
31. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001; 292: 1389-94.

